

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 August 2001 (15.08.01)	
International application No. PCT/DE00/03104	Applicant's or agent's file reference PCT/MDC 9917
International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00)	Priority date (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)
Applicant BIRCHMEIER, Walter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

09 April 2001 (09.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**RECEIVED**

JUN 27 2002

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

10/069896

Applicant's or agent's file reference PCT/MDC 9917		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/03104	International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00)	Priority date (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC			
Applicant MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN			

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 April 2001 (09.04.01)	Date of completion of this report 09 January 2002 (09.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/03104

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-10, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims, Nos. 1-9, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/15-15/15, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 00/03104

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Since the subject matter of Claims 1 and 5-9 of the application was not searched, a report as to the novelty, inventive step and industrial applicability of these claims cannot be drawn up.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/03104

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-4	YES
	Claims	2	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	2-4	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	2-4	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

D1: WO-A-98/42296 (ONYX PHARMA INC) 1 October 1998 (1998-10-01), mentioned in the application.

The present application relates to substances which prevent the bonding of beta-catenin to LEF-1/TCF transcription factors, APC or conductin/axin (Claims 1, 5-9) and a method for locating such substances (Claims 2-4).

The subject matter of Claim 2 is anticipated by the teaching of D1 (cf. pp. 12-14) and is consequently not novel (PCT Article 33(2)).

The present application addresses the problem of providing a method for locating substances which prevent the bonding of beta-catenin to LEF-1/TCF-transcription factors, APC or conductin/axin.

This problem is already solved in D1, as shown above.

In order to arrive at the method as per Claims 3 and 4 of the application, a person skilled in the art merely had to develop the screening method proposed in D1 in a manner that is known per se.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/DE 00/03104

Since this does not require any inventiveness, the subject matter of Claims 2-4 of the application does not meet the requirements of PCT Article 33(3).

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 00/03104

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "similar" used in Claim 4 is unclear and leaves the reader uncertain as to the meaning of the technical features in question. Consequently, the subject matter of this claim is not clearly defined (PCT Article 6).

Claim 3 does not meet the requirements of PCT Article 5 because the final step (modification of the compounds detected) is not disclosed in the description.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/MDC 9917	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 03104	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/09/1999
Anmelder  MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 15

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1,4-9

Die anmeldungsgemässen Ansprüche 1 und 8 beziehen sich auf ein bestimmte chemische Verbindungen bzw. Pharmazeutika, die lediglich durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft charakterisiert sind, nämlich die Bindung von beta-Catenin an LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin/ Axin zu verhindern.

Zu den Ansprüchen 5-7 und 9 ist folgendes anzumerken:

Es wird die Oberfläche des beta-Catenins berechnet und daraufhin entsprechende Moleküldatenbanken nach Verbindungen durchsucht, welche in die entsprechenden hydrophoben Tachen des beta-Catenins passen könnten (und diese damit blockieren). In der sogenannten "drug list" sind - als Ergebnis dieser Recherche - bereits bekannte Verbindungen aufgeführt, so dass das Kriterium der Neuheit für keinen dieser Ansprüche erfüllt wäre.

Die Ansprüche 5-7 und 9 erstrecken sich in recht vager Weise auch auf im Stand der Technik nicht bekannte Derivate dieser bekannten Verbindungen, die wünschenswerterweise die anmeldungsgemässe Aufgabe erfüllen würden, jedoch ist in der Beschreibung keine einzige Verbindung tatsächlich beschrieben.

Das einzige Experiment, das in der Beschreibung aufgeführt ist, ist des Test der bekannten Substanz Cefamandole auf Hemmung der Interaktion von LEF-1 mit beta-Catenin.

Somit fehlen den Ansprüchen 1 und 5-9 die entsprechende Stütze bzw. der Anmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich ist.

Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

Was Anspruch 4 angeht, ist nicht klar, ob es sich um einen Verfahrensanspruch oder einen Produktanspruch handelt (die Formulierung "die damit Gegenstand des Anspruchs werden" gegen Ende des Anspruchs deutet auf letzteres hin). Der letzte Absatz von Anspruch 4 ist darüber hinaus so vage formuliert (die nicht in der Anmeldung offenbarten chemisch optimierten Substanzen, die auf den bekannten Verbindungen der "Drug-Liste" und "Positiv-Liste" basieren, sind lediglich durch eine wünschenswerte Eigenschaft (Inhibition der Komplexbildung von beta-Catenin und seinen Bindungspartnern, experimentell zu überprüfen durch ELISA-Test) definiert, so dass der abgedeckte Bereich völlig unklar wird), dass eine Recherche nicht möglich ist.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Daher wurde die Recherche auf diejenigen Ansprüche beschränkt, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Verfahrensansprüche 2-3.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/03104

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C07K14/47 G01N33/50 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 42296 A (ONYX PHARMA INC) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) in der Anmeldung erwähnt Seite 12 -Seite 14 ---	2,3
A	WO 99 42481 A (BIRCHMEIER WALTER ;MAX DELBRUECK CENTRUM (DE); VON KRIES JENS PETE) 26. August 1999 (1999-08-26) Zusammenfassung --- -/--	2,3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. November 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fritz, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MORIN P J ET AL: "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 275, 21. März 1997 (1997-03-21), Seiten 1787-1790, XP002088507 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument -----</p>	2,3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

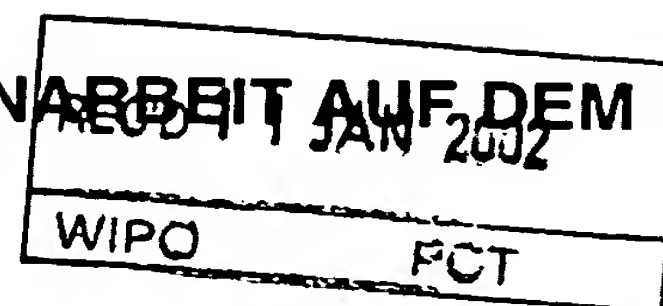
Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/03104

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9842296	A	01-10-1998	AU	6866198 A	20-10-1998
			CN	1253586 T	17-05-2000
			EP	0970120 A2	12-01-2000
			WO	9842296 A2	01-10-1998
-----					
WO 9942481	A	26-08-1999	WO	9942481 A2	26-08-1999
			DE	19909251 A1	26-08-1999
			EP	1054899 A2	29-11-2000
-----					

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS



## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/MDC 9917	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/03104	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 16/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K31/00		
Anmelder MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  09/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  09.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Fritz, M  Tel. Nr. +49 89 2399 2792  



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-10                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-9                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/15-15/15              ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung.

☒ Ansprüche Nr. 1,5-9.

**Begründung:**

☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 1,5-9 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.



**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3-4
	Nein: Ansprüche	2
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	2-4
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	2-4
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Da der Gegenstand der anmeldungsgemäßen Ansprüche 1 und 5-9 nicht recherchiert wurde, kann zur Neuheit, erfinderischen Tätigkeit und gewerblichen Anwendbarkeit dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt werden.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

D1: WO 98 42296 A (ONYX PHARMA INC) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) in der Anmeldung erwähnt

Die vorliegende Anmeldung bezieht sich auf Substanzen, welche die Bindung von beta-Catenin an LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin/Axin verhindern (Ansprüche 1,5-9) sowie ein Verfahren zum Auffinden solcher Substanzen (Ansprüche 2-4).

Der Gegenstand des Anspruchs 2 ist durch die Lehre von D1 (vgl. S. 12-14) vorweggenommen und somit nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT.

Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war es, ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, welche die Bindung von beta-Catenin an LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin/Axin verhindern, bereitzustellen.

Die Aufgabe wurde bereits in D1 gelöst, wie oben gezeigt wurde.

Um zu den anmeldungsgemäßen Verfahren gemäß Anspruch 3 und 4 zu gelangen, mußte der Fachmann lediglich die in D1 vorgeschlagene Screening-Methode in an sich bekannter Weise ausarbeiten.

Da hierzu ein erfinderisches Zutun nicht erforderlich gewesen wäre, erfüllt der Gegenstand der anmeldungsgemäßen Ansprüche 2 - 4 nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

**Zu Punkt VIII**

**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Der in Anspruch 4 benutzte Ausdruck "ähnlichen" ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung der betreffenden technischen Merkmale im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

Anspruch 3 erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 5 PCT, weil der letzte Schritt (Modifikation der ermittelten Verbindungen) nicht in der Beschreibung offenbart ist.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/19353 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 31/00 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03104
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
7. September 2000 (07.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 44 404.8 16. September 1999 (16.09.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- Veröffentlicht:  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BIRCHMEIER, Walter [DE/DE]; Goethestrasse 14, 16341 Schwanebeck (DE). VON KRIES, Jens-Peter [DE/DE]; Meraner Strasse 49 b, 16341 Zepernick (DE).
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.
- (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(54) Title: AGENTS FOR TREATING HUMAN DISEASES, ESPECIALLY FOR TREATING TUMORS SUCH AS COLONIC CANCERS AND MELANOMAS OR FOR REGENERATING TISSUE AND PROMOTING HAIR GROWTH

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR THERAPIE VON MENSCHLICHEN ERKRANKUNGEN, INSBESONDERE FÜR DIE THERAPIE VON TUMOREN WIE KOLONKARZINOMEN UND MELANOMEN ODER ZUR GEWEBEREGENERATION UND FÖRDERUNG DES HAARWUCHSES

(57) Abstract: The invention relates to agents for treating human diseases which are based on substances that specifically influence the binding of  $\beta$ -catenin on LEF-1/TCF- transcription factors, APC or conductin/axin. The invention particularly relates to the identification and use of hydrophobic pockets on the molecular surface in the proximity of the essential binding points for the binding partners of  $\beta$ -catenin with the aim of optimizing these substances. The invention also relates to the use of the substances, preferably for treating tumors such as colonic cancers and melanomas or for regenerating tissue and promoting hair growth.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die spezifisch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an LEF-1/TCF-Trankriptionsfaktoren, APC oder Conductin/Axin beeinflussen. Sie betrifft insbesondere die Identifikation und Nutzung von hydrophoben Taschen auf der Moleküloberfläche in der Nähe der essentiellen Bindungsstellen für die Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin mit dem Ziel, diese Substanzen zu optimieren. Sie betrifft ferner die Anwendung der Substanzen, bevorzugt für die Therapie von Tumoren wie Kolonkarzinomen und Melanomen oder zur Geweberegeneration und Förderung des Haarwuchses.

WO 01/19353 A2

**BEST AVAILABLE COPY**

**Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen, insbesondere für die Therapie von Tumoren wie Kolonkarzinomen und Melanomen oder zur Geweberegeneration und Förderung des Haarwuchses**

5 **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen auf der Basis von Substanzen, die die Bindung von  $\beta$ -Catenin an LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin/Axin verhindern. Bevorzugt sind diese Mittel zur Therapie von  
10 Tumoren wie Kolomkarzinomen und Melanomen oder zur Geweberegeneration und Förderung des Haarwuchses einsetzbar. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

$\beta$ -Catenin ist ein zytoplasmisches Protein mit verschiedenen Funktionen in der Zelle. Im  
15 Komplex mit den Zelladhäsionsmolekülen der Cadherin-Familie stellt  $\beta$ -Catenin die Verbindung zum Zytoskelett her (Hülsken, J. et al., E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J-Cell-Biol. 127: 2061-9, 1994). Zusätzlich ist  $\beta$ -Catenin eine Komponente der Wnt-Signaltransduktion, die in der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielt. Der Transkriptionsfaktor LEF-1 wurde als  
20 Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin in dieser Signalkaskade indentifiziert (Behrens, J. et al., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature, 382: 638-42, 1996). Der Mechanismus der Signaltransduktion durch  $\beta$ -Catenin und LEF-1 ist geklärt: Er besteht in dem durch LEF-1 vermittelten Transport von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Im Zellkern reguliert dieser Komplex die Genexpression durch die im Komplex  
25 veränderte, LEF-1 induzierte DNA-Biegung und durch die carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne von  $\beta$ -Catenin. Inzwischen wurde gezeigt, daß auch andere Mitglieder der LEF-1/TCF-Familie von Transkriptionsfaktoren, z.B. TCF-4 diese Signaltransduktion vermitteln können (Korinek, V. et al., Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science, 275: 1784-  
30 87, 1997).

Voraussetzung für diese  $\beta$ -Catenin-abhängige Signaltransduktion ist die Stabilisierung des zytoplasmatischen Pools von freiem, nicht Cadherin-gebundenem  $\beta$ -Catenin. Dieser Pool wird durch die Glykogen-Synthetase-Kinase  $3\beta$ , durch das Tumorsuppressor-Genprodukt  
35 APC sowie durch Conductin/Axin negativ reguliert.

Für Karzinome und Melanome wurde gezeigt, daß Mutationen im N-Terminus von  $\beta$ -Catenin oder in der  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne von APC diese Regulation aufheben



(Morin, P.J. et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science, 275: 1787-90, 1997). Als Konsequenz wird der  $\beta$ -Catenin-Pool stabilisiert. In Melanomen führt diese Stabilisierung zur LEF-1 vermittelten Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, während in Kolonkarzinomen vor allem TCF-4 diese Funktion erfüllt. Die transkriptionelle Aktivität des Komplexes in Karzinom-Zelllinien wurde durch die Aktivierung eines Reportergens belegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß diese Aktivität in APC-defizienten Kolonkarzinom-Zelllinien nach Wiedereinführung von APC inhibiert wurde.

APC-Mutationen wurden in der überwiegenden Mehrheit von Kolonkarzinomen identifiziert, während nicht APC-defiziente Tumore Mutationen im  $\beta$ -Catenin  $\beta$ -Catenin-Gen aufweisen. Das Resultat dieser Mutationen von APC oder  $\beta$ -Catenin ist die Aktivierung der Signaltransduktion durch den  $\beta$ -Catenin-LEF/TCF-Komplex. Es unterstreicht die Schlüsselrolle von  $\beta$ -Catenin in der Tumorentstehung. Da APC-Mutationen als ein frühes Ereignis in der Entstehung von Kolontumoren identifiziert wurden, ist die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-LEF/TCF-Komplexes ein zentraler Schritt in der Tumorentstehung.

In der Maus wurde gezeigt, daß die Deletion des Gens für LEF-1 oder die Expression von  $\beta$ -Catenin-Mutanten, die gegenüber dem Abbau in der Zelle stabilisiert sind, unter anderem zur Störung der Entwicklung von Haarfollikeln führt. Interessanterweise führt die Expression von stabilisiertem  $\beta$ -Catenin zur Vermehrung der Anzahl der Haarfollikel (Gat U. et al., 1998. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. Cell 95:605-14) und die Inaktivierung von LEF-1 zur Störung der Entwicklung von Haarfollikeln, Brustdrüsen und Zähnen (van Genderen et al., 1994. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. Genes Dev. 8:2691-703 ). Diese Befunde weisen darauf hin, daß der Komplex von LEF/TCF und  $\beta$ -Catenin an diesen Entwicklungsprozessen beteiligt ist.

Es wurde bereits versucht, die Schlüsselrolle von  $\beta$ -Catenin in der Tumorentstehung für die Entwicklung von Tumorthapeutika auszunutzen. In den USA wurden zwei Patentanmeldungen vorgenommen, die als WO-Schriften veröffentlicht wurden. In WO 98/41631 (John Hopkins Universität - B. Vogelstein) wird die Beeinflussung von Interaktionen von  $\beta$ -Catenin, TCF-4 und dem Tumorsuppressor-Protein APC mit dem Ziel der Verhinderung von Krebsentstehung beansprucht. Dabei wurde gezeigt, daß Produkte von mutierten APC-Genen, die in Kolorektal-Tumoren nachgewiesen wurden, die  $\beta$ -Catenin/TCF-4-Transkriptionsaktivierung nicht mehr regulieren können. Weiterhin weisen Kolorektal-Tumore mit intakten APC-Genen Aktivierungsmutationen von  $\beta$ -Catenin im N-Terminus auf, was die Funktion der wichtigen Phosphorylierungsorte beeinflußt. Daraus

wird abgeleitet, daß die Regulierung von  $\beta$ -Catenin für den Tumorsuppressorwirkung von APC kritisch ist und daß diese Regulierung durch Mutationen in APC oder in  $\beta$ -Catenin umgangen werden kann. Der Hauptanspruch betrifft das intronfreie DNA-Molekül, welches für TCF-4 kodiert.

- 5 WO 98/42296 (Onyx Pharmaceuticals Inc. - Rubinfeld) betrifft Zusammensetzungen und Methoden zur Diagnose und zur Behandlung von Krankheiten, die durch  $\beta$ -Catenin/Transkriptionsfaktor-Interaktionen ausgelöst werden. Der Hauptanspruch betrifft das isolierte, stabilisierte  $\beta$ -Catenin und seine Fragmente, solche Fragmente sind allerdings nicht angegeben worden.

10

Im weiteren wurde vorgeschlagen, Peptide oder davon abgeleitete Strukturen, die aus  $\beta$ -Catenin oder seinen Interaktionspartnern stammen und die Interaktionen spezifisch beeinflussen, zu finden (DE 198 07 390.9 vom 21.02.98).

- 15 Die hier beschriebene Erfindung hat zum Ziel, neue Mittel zur Behandlung von Karzinomen bzw. aberranter Gewebs- und Organentwicklung zur Verfügung zu stellen. Ihr liegt die spezielle Aufgabe zugrunde, die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC und Conductin/Axin als Voraussetzung der Translokation und der Aktivität des Komplexes im Zellkern zu beeinflussen. Diese Aktivität muß  
20 spezifisch sein, d.h. sie darf nicht gleichzeitig mit anderen Interaktionen von  $\beta$ -Catenin interferieren.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, wesentliche Basis der Erfindung ist das überraschende Auffinden von separaten essentiellen Bindungsstellen dieser  
25 Interaktionspartner im  $\beta$ -Catenin-Molekül.

- Der Kerngedanke besteht besteht darin, (1.) basierend auf den Kristallstrukturdaten und Oberflächenberechnungen für  $\beta$ -Catenin nach hydrophoben Taschen in der Nähe der essentiellen Bindungsstellen von LEF-1/TCF, APC oder Conductin/Axin zu suchen. Eine  
30 solche hydrophobe Tasche benachbart zur LEF/TCF Bindungsstelle wurde gefunden und charakterisiert (2.) Die hydrophoben Taschen benachbart der essentiellen Bindungsstellen werden zur Computer-gestützten Findung von niedermolekularen Substanzen genutzt, die in diesen Taschen binden können. (3.) Diese Substanzen werden im ELISA mit rekombinantem  $\beta$ -Catenin und einzelnen Interaktionspartnern auf Inhibitionseffektivität  
35 getestet. (4.) Auf den Kristall-Strukturdaten von  $\beta$ -Catenin basierend sollen die Substanzen durch Einführung von Seitengruppen optimiert werden, die zusätzlich durch Wechselwirkung mit den benachbarten Aminosäure-Resten der essentiellen Bindungsstellen (z.B. der LEF/TCF-Bindungsstelle: Lys 435, Arg 469, His 470, Lys 508

und Arg 515; oder der APC-Bindungsstelle für die 20 Aminosäure-Repeat-Domäne: Lys 345, Trp 383 oder der 15 Aminosäure-Repeat-Domäne Arg 386; oder der Conductin-Bindungsstelle: Phe 253, His 260, Lys 292) in ihrer Bindung stabilisiert werden.

5 Im folgenden wird die Erfindung näher erläutert

In der ersten Realisierung der Erfindung wurden  $\beta$ -Catenin-Mutanten identifiziert, die die jeweilig essentielle Bindungsstelle für LEF-1/TCF-4, für die 20 Aminosäure-Repeats von APC oder für Conductin markieren (Abb. 1). Die Substitution einzelner basischer Aminosäure-Reste durch Alanin-Reste erzeugte diese Punkt-Mutanten. Da die essentiellen  
10 Bindungsstellen der Faktoren in getrennten Subregionen von  $\beta$ -Catenin lokalisieren, werden Substanzen die in der Nachbarschaft dieser Bindungsstellen binden nur spezifisch jeweils eine Interaktion beeinflussen. Diese Substanzen können gemäß der Erfindung für die Tumorthherapie oder Geweberegeneration eingesetzt werden.

15 In einem zweiten Schritt wurden basierend auf den Röntgenkristall-Strukturdaten der Armadillo-Domäne von  $\beta$ -Catenin die Oberflächen in dieser Region berechnet. Durch Nutzung verschiedener Computerprogramme wie z.B. Grasp, SPOCK oder LUDI (MSI) wurde eine hydrophobe Tasche in der Nähe der Bindungsstelle für LEF-1/TCF-4 identifiziert (umrandet von den Aminosäuren Val 358, Met 363, Ala 391, Ala 392, Thr  
20 393, Lys 394, Gln 395, Met 398, Leu 401, Leu 402, Ile 423, Asn 426, Leu 427, Thr 428, Cys 429, Asn 430, Asn 431, Asn 434, Met 437, Val 438). Diese hydrophobe Tasche bildet ein ideales molekulares Ziel für die Generation von Substanzen, die in dieser Tasche binden und Kontakte zur dicht benachbarten essentiellen Bindungsstelle herstellen. Aus energetischen Gründen ist diese Bindung favorisiert, da keine Hydrathülle zur Bindung  
25 verdrängt werden muß. Es ist möglich, daß ein Phenylalanin-Rest von LEF/TCF (Phe 24 von LEF-1 oder Phe 21 von TCF-4), der normalerweise für die Bindung an  $\beta$ -Catenin essentiell ist (DE 199 09 251 vom 22.2.99), in dieser Tasche bindet. Somit könnten die Substanzen einzig durch die Bindung in der Tasche diesen Kontaktpunkt in  $\beta$ -Catenin blockieren.

30 In einem dritten Schritt wurden computergestützt niedermolekulare Substanzen aus Molekül-Datenbanken in diese Tasche eingepaßt und aufgrund der Anzahl der stabilisierenden Wechselwirkungen mit  $\beta$ -Catenin ausgewählt. Diese Substanzen werden unten genannt (Tabelle: "Drug-Liste"). Die Grundstrukturen dieser niedermolekularen Verbindungen sollen nach der experimentellen Überprüfung ihrer Inhibitions-Funktion  
35 (z.B. im ELISA, Tabelle: "Positiv-Liste") modifiziert werden, um ihre Funktion zu optimieren. Hierfür ist die Idee leitend, das die Modifikation der Substanzen z.B. durch Einführung saurer Gruppen, zusätzliche Wechselwirkungen mit den basischen Resten der Aminosäuren Lys 435, Arg 469, His 470, Lys 508 oder Arg 515 von  $\beta$ -Catenin ermöglicht.



Da diese Reste die essentielle Bindungsstelle der LEF/TCF-Faktoren markieren, sollten diese zusätzlichen Wechselwirkungen die Effektivität der Substanzen verstärken.

Die Anwendung dieser Strategie auf alle essentiellen Bindungsstellen von  $\beta$ -Catenin ermöglicht die Generierung neuer Pharmaka, die durch spezifische Beeinflussung der jeweiligen Interaktion von  $\beta$ -Catenin z.B. mit den Transkriptionsfaktoren LEF/TCF, dem Tumorsuppressor-Genprodukt APC oder mit Conductin die Entwicklung von Tumoren inhibieren oder zur Regeneration der Haut und zur Förderung der Haarbildung eingesetzt werden. Diese Möglichkeiten der Beeinflussung ergeben sich aus den publizierten Befunden zur Funktion der jeweiligen Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit seinen Bindungspartnern in diesen Entwicklungsprozessen.

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Identifizierung von separaten, essentiellen Bindungsstellen von  $\beta$ -Catenin für die Interaktion mit LEF-1/TCF-4, mit den 20 und 15 Aminosäure-Repeats von APC oder Conductin/Axin

Basierend auf der Röntgen-Kristall-Strukturanalyse der Armadillo-Domäne von  $\beta$ -Catenin (Huber et al., 1997) wurden ausgewählte basische und aromatische Aminosäure-Reste durch Alanin-Reste substituiert und die Punktmutanten auf Interaktion mit den Bindungspartnern von  $\beta$ -Catenin im Hefe-2-Hybrid-System analysiert (Abb. 1). Die Mutationen, welche spezifische Interaktionen blockieren, bilden Cluster in separaten Subregionen der Domäne. Sie markieren die essentiellen Kontaktpunkte in den spezifischen Bindungsstellen für die Interaktion mit LEF/TCF (Lys 435, Arg 469, His 470, Lys 508, Arg 515), mit den 20 Aminosäure-Repeats von APC (Trp 383, Lys 345), mit den 15 Aminosäure-Repeats von APC (Arg 386), oder mit Conductin (Phe 253, His 260, Lys 292). Die erweiterten Interaktionsstellen sind der Abb 1 zu entnehmen.

2. Analyse der Moleküloberfläche von  $\beta$ -Catenin im Bereich der essentiellen Bindungsstelle für LEF/TCF

Ausgehend von den Daten zur Röntgenkristallstruktur von  $\beta$ -Catenin wurde mit den Programmen Grasp und LUDI (MSI) die Moleküloberfläche im Bereich der Bindungsstelle berechnet. Es ist hierdurch gelungen eine hydrophobe Tasche zu identifizieren (Abb.2), die von den folgenden Aminosäuren umrandet ist: Val 358, Met 363, Ala 391, Ala 392, Thr 393, Lys 394, Gln 395, Met 398, Leu 401, Leu 402, Ile 423, Asn 426, Leu 427, Thr 428, Cys 429, Asn 430, Asn 431, Asn 434, Met 437, Val 438. Diese Tasche lokalisiert in engster Nachbarschaft zu der essentiellen Bindungsstelle für LEF/TCF. Sie ist von großer Bedeutung für die Computer-gestützte Durchmusterung von Substanzbibliotheken zur

Selektion von Molekülen, die in dieser Tasche binden. Die Idee primär hydrophobe Wechselwirkungen in der Tasche zum Ausgangspunkt zu wählen, hat den energetischen Vorteil, das die Substanzen nicht mit der Hydrathülle der geladenen Aminosäure-Reste der Oberfläche kompetieren müssen. Diese Substanzen stellen somit nach gezielter  
5 Modifikation potente Therapeutika zur Behandlung von Tumoren dar, da die Interaktion von LEF/TCF mit  $\beta$ -Catenin ein frühes Ereignis zur Entstehung von Tumoren darstellt. Sie wurden experimentell auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der onkogenen Interaktion getestet (ELISA) und sollen modifiziert werden. Das molekulare Modellieren der Substanzen in der Tasche basiert auf der Idee, die Wechselwirkungen in der Tasche selbst zu stabilisieren  
10 und zusätzliche Kontakte zu den essentiellen Aminosäure-Resten der LEF/TCF-Bindungsstelle zu schaffen. Durch diese Strategie sollen die Substanzen in ihrer Wirkung optimiert werden.

### 3. Identifizierung von Substanzen die in der hydrophoben Tasche binden

15

Es wurden Computer-gestützt Substanzbibliotheken durchmustert und deren Moleküle auf stabilisierende Wechselwirkungen in der hydrophoben Tasche ausgewählt. Die ausgewählten Substanzen wurden auf Hemmung der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und LEF-1 im ELISA experimentell getestet. Die Grundstrukturen der ausgewählten und im  
20 ELISA wirksamen Substanzen bilden unterschiedliche Molekülklassen, die im folgenden dargestellt sind:

#### Molekülklasse I:

A: Cephalosporine von gleicher Grundstruktur wie die Substanz "Cefamandole" mit  
25 einer für die Hemmung der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und LEF/TCF ( $IC_{50}$ = 25-100 $\mu$ M) essentiellen Kernstruktur. Diese Kernstruktur besteht aus einem aromatischem Ring (beim Cefamandole am Kohlenstoffatom 17, Numerierung siehe "Positiv-Liste"), einer organischen Komponente, die der Struktur des Ala-Ala Dipeptides ähnelt, und einem  $\beta$ -Lactam- und Thiazolring. Mit dem aromatischen Ring wurde die  
30 Substanz in der beschriebenen hydrophoben Tasche eingepaßt. Verwandte Cephalosporine ohne diesen aromatischen Ring weisen keine Hemmwirkung auf. Zusätzlich wurden stabilisierende Wasserstoffbrücken zwischen einer Carbonylgruppe (Kohlenstoffatom 17) der Substanz mit dem Ser 389 von  $\beta$ -Catenin und einer Carboxylgruppe (Kohlenstoffatom 8, am Thiazolring) und dem Lys 394 von  $\beta$ -Catenin  
35 berechnet. Weitere Vertreter dieser Molekülklasse mit experimentell bestätigter Hemmung der Komplexbildung sind die Cephalosporine Cefamandole-Nafate, Cefsulodine und Cefadroxil ( $IC_{50}$ = 50-100 $\mu$ M). Grundsätzlich wird der Anspruch auf alle Cephalosporine mit dergleichen Kernstruktur wie der des Cefamandoles als

Leitstruktur zur Entwicklung eines Heilmittels oder unmodifiziert als Heilmittel zur Bekämpfung von Tumoren und Krebs erhoben.

B: Die Substanz AC-(6-O-Stearoyl)-Muramyl-Ala-D-Isoglutamine gehört der Struktur nach zu einer anderen Subklasse von Inhibitoren der Komplexbildung ( $IC_{50}=100\mu M$ ).

5 C: Die Substanz 3,6-Dihydroxybenzonobornane gehört der Struktur nach zu einer anderen Subklasse von Inhibitoren der Komplexbildung ( $IC_{50}=100\mu M$ ).

#### Molekülklasse II:

10 Substanzen die ebenfalls in der hydrophoben Tasche benachbart zur essentiellen Bindungsstelle von  $\beta$ -Catenin für LEF/TCF binden, die jedoch nicht die Komplexbildung hemmen, da sie entweder zu klein sind um die Komplexbildung zu stören oder in anderer Ausrichtung als die Substanzen der Molekülklasse I in der Tasche binden. Für diese Substanzen wurde jedoch im Experiment eine starke Beeinflussung der Wirkung der Moleküle der Klasse I durch Konkurrenz der Bindung  
15 in der Tasche belegt. Diese Moleküle dienen somit ebenfalls als Leitstrukturen zur Modifikation und Entwicklung potenter Inhibitoren der Komplexbildung von LEF/TCF in Tumoren.

20 Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

1. Herstellung und Testen von Mutanten von  $\beta$ -Catenin, die die essentiellen Bindungsstellen für LEF-1, APC und Conductin markieren.

Die Mutagenese von  $\beta$ -Catenin in den Armadillo-Repeats 3-8 wurde mit dem "Mutagenese  
25 Kit" der Firma Clontech nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und die Mutanten durch Sequenzierung überprüft. In allen Mutanten wurde die ursprüngliche Aminosäure durch Alanin substituiert. Für die Analyse der Interaktionen wurde die für die Aminosäuren Leu218-Leu781 kodierende cDNA von humanen  $\beta$ -Catenin (Armadillo-Repeat 3 bis zum C-terminalen Ende des Proteins) oder seinen Mutanten in den  
30 Fusionsvektor für die Aktivierungsdomäne von Gal-4 (pGAD424, Clontech) kloniert. Die cDNA für die Bindungsdomänen der Interaktionspartner wurde in den LexA-Fusionsvektor BTM116 kloniert. Hierfür wurde die cDNA von LEF-1 für die Aminosäuren 1-99, von Conductin für die Aminosäuren Ala342-Arg465, von humanen APC für die Aminosäuren His1012-Glu1215 (APC 15 Aminosäure-Repeats) und für die Aminosäuren  
35 Ser1259-Asp1400 (APC 20 Aminosäure-Repeats) mit entsprechenden Primern PCR amplifiziert. Die Interaktion der Lex-A-Hybride mit  $\beta$ -Catenin und seinen Mutanten wurde anhand der b-Galaktosidase-Reporteraktivität im Hefe 2-Hybrid System (Protokoll: "Matchmaker", Clontech) quantifiziert (Abb.1).



2. Identifizierung einer hydrophoben Tasche in  $\beta$ -Catenin benachbart zur essentiellen Bindungsstelle für LEF-1. Zur Berechnung der Moleküloberfläche von  $\beta$ -Catenin wurden verschiedene die Computer-Programme wie z.B. GRASP, SPOCK und LUDI von MSI benutzt.

3. Identifizierung von Substanzen die in der hydrophoben Tasche bei der essentiellen Bindungsstelle für LEF-1 binden.

Für die Suche von Substanzen die in der hydrophobe Tasche binden können wurden verschiedene Substanz-Bibliotheken zum Beispiel die "Available Chemicals Database, ACD" von MSI und die Programme LUDI, SPOCK und GRASP benutzt.

4. ELISA zum Test der Substanzen auf Hemmung der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und LEF-1.

Für den Test der ausgewählten Substanzen auf Hemmung der LEF-1  $\beta$ -Catenin Interaktion wurden zuerst beide Proteine in Bakterien rekombinant mit N-terminalen Histidin-Sequenzen hergestellt und durch Nickel-Chromatographie gereinigt (Behrens et al. 1996). Ca. 50 ng LEF-1 wurde an den Näpfen von ELISA-Platten für 60 Minuten bei Raumtemperatur in PBS/BSA (0.1 mg BSA/ml) adsorbiert. Anschließend wurden die Näpfe mit 2.5% Magermilch-Pulver/0.5% BSA in PBS für 2 Stunden bei 8° C abgedeckt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in PBS/BSA (10  $\mu$ g BSA/ml). Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS wurden die in DMSO gelösten Substanzen ad 10% DMSO final und den angegebenen Endkonzentrationen der Substanzen zugegeben. Die Inkubation mit 50-100 ng  $\beta$ -Catenin wurden für 15 Minuten in PBS/BSA (0.5 mg BSA/ml) durchgeführt. Die Komplexbildung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin wurde durch den Antikörper PA2 gegen den Carboxy-Terminus von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen (Hülsken et al. 1994). PA2 wurde für 15 Minuten in einer Titerverdünnung von 1:10000 in 1% BSA/PBS zugegeben. Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS erfolgte die Quantifizierung der Komplexbildung mit Peroxidase konjugierte Nachweisantikörper (1:2000 in 1% BSA/PBS, Dianova) und durch photometrische Messung des Umsatzes von o-Phenylendiamin als Substrat bei 450 nm (Ultramark ELISA-Reader, BioRad). Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10 mM eingesetzt. Als Kontrolle der spezifischen Inhibition der Komplexbildung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin, wurde  $\beta$ -Catenin in den Näpfen adsorbiert und nach Inkubation mit den Substanzen nachgewiesen. Substanzen, die in der hydrophoben Tasche von  $\beta$ -catenin binden ohne die Komplexbildung mit LEF-1 zu behindern, wurden aufgrund ihrer Konkurrenz um diese Bindungsstelle mit den Substanzen mit Hemmwirkung identifiziert. Hierfür wurde z.B. Cefamandole als Substanz

mit Hemmwirkung in seiner halbmaximal wirksamen Konzentration ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ) mit jeweils einer der anderen Substanzen in dergleichen Konzentration ( $100 \mu M$ ) in einem Bindungsansatz im ELISA zusammen eingesetzt. Substanzen, die am gleichen Ort wie Cefamandole binden, aber allein eingesetzt die Komplexbildung nicht hemmen, können die Bindung von Cefamandole beeinflussen.

#### Legende zu den Abbildungen und Tabellen

Abb.1 Identifizierung der essentiellen Bindungsstellen von  $\beta$ -Catenin für LEF-1, die 20 Aminosäure-Repeats von APC oder Conductin

(A-D) Interaktion von  $\beta$ -Catenin-Mutanten mit LEF-1, APC (15- und 20 Aminosäure-Repeats) und Conductin im Hefe-2-Hybrid-System. Die durch Alanin substituierten Aminosäure-Reste in den  $\beta$ -Catenin-Punktmutanten und deren Position in den Arm-Repeats 3-8 sind unten angegeben. Die Interaktion wurde durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Reporteraktivität quantifiziert und ist im Verhältnis zur Interaktion mit Wildtyp  $\beta$ -Catenin angegeben. (E) Darstellung der separaten essentiellen Bindungsstellen in der Armadillo-Domäne von  $\beta$ -Catenin (RasMol).

Abb.2 Charakterisierung einer hydrophoben Tasche benachbart zur essentiellen Bindungsstellen von  $\beta$ -Catenin für LEF-1/TCF

(A) Aufsicht der hydrophoben Tasche in der Moleküloberfläche von  $\beta$ -Catenin (RasMol). Die Tasche wird durch die in orange oder gelb markierten Aminosäuren umrandet. Die Aminosäurereste der essentiellen Bindungsstelle für LEF/TCF sind blau markiert. Die entsprechenden Aminosäuren wurden gekennzeichnet. (B) Seitenansicht der hydrophoben Tasche.

Abb.3 Substanzen, die in der hydrophoben Tasche von  $\beta$ -Catenin binden

(A) Oberflächendarstellung der Region der hydrophoben Tasche (Grasp). Die Aminosäurereste der essentiellen Bindungsstelle für LEF/TCF sind blau markiert (für die Mutationen, die die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF blockieren: Lys435, Arg 469 und His 470). (B) Im  $\beta$ -Catenin-Molekül ist eine der niedermolekularen Substanzen dargestellt, die in der Tasche bindet.

Abb. 4 Cefamandole als Vertreter der Molekülklasse I hemmt die Komplexbildung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin im ELISA.

5 Ansteigende Konzentrationen von Cefamandole (15-250  $\mu$ M) führen zur Abnahme der Komplexbildung von rekombinant hergestelltem und gereinigtem LEF-1 und  $\beta$ -Catenin Protein im ELISA ( $IC_{50}=25 \mu$ M).

Tabelle 1: Substanzen die nach Computer-Berechnungen (u.a. LUDI/MSI) potentiell in der hydrophoben Tasche binden ("Drugs-Liste")

10

Tabelle 2: "Positivliste" von Substanzen die die Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und LEF-1 im ELISA hemmen oder die Wirkung von Cefamandole beeinflussen.

**BEST AVAILABLE COPY****Patentansprüche:**

1. Mittel zur Therapie von menschlichen Erkrankungen, enthaltend Substanzen, die die Bindung von  $\beta$ -Catenin an LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin/Axin verhindern.  
5
2. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die Bindung von  $\beta$ -Catenin selektiv an LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin/Axin verhindern, dadurch gekennzeichnet, daß im  $\beta$ -Catenin-Molekül in Nachbarschaft zu essentiellen Bindungsstellen hydrophobe Taschen identifiziert und nachfolgend die in diese Tasche passenden therapeutischen Substanzen synthetisiert und getestet werden.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß  $\beta$ -Catenin-Mutanten identifiziert wurden, die die jeweilig essentielle Bindungsstelle für LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren, APC oder Conductin markieren,  
15
  - die Oberflächen in dieser Region basierend auf den Röntgenkristall-Strukturdaten der Armadillo-Domäne berechnet und dadurch die vorhandenen hydrophoben Taschen identifiziert werden,
  - niedermolekulare Verbindungen in diese Tasche eingepaßt und aufgrund der stabilisierenden Wechselwirkungen mit  $\beta$ -Catenin und selektiven Hemmung oder Förderung der Komplexbildung mit LEF/TCF, APC oder Conductin im biologischen Test ausgewählt werden und  
20
  - diese Verbindungen ggf. durch Einführung saurer Gruppen weiter modifiziert werden.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die  $\beta$ -Catenin-Mutanten Lys 435, Arg 469, His 470, Lys 508, Arg 515 die die essentielle Bindungsstelle für LEF-1 markieren
  - die  $\beta$ -Catenin-Mutanten Phe 253, His 260, Lys 292, die die essentielle Bindungsstelle für Conductin markieren
  - 30 - die  $\beta$ -Catenin-Mutanten Lys 345, Trp 383, Arg 386, die die essentielle Bindungsstelle für APC markieren  
identifiziert wurden,
  - die Moleküloberfläche mit dem Programm Grasp, LUDI (MSI) und ähnlichen Programmen berechnet wird,
  - 35 - eine hydrophobe Tasche (umrandet von den Aminosäuren Val 358, Met 363, Ala 391, Ala 392, Thr 393, Lys 394, Gln 395, Met 398, Leu 401, Leu 402, Ile 423, Asn 426, Leu 427, Thr 428, Cys 429, Asn 430, Asn 431, Asn 434, Met 437, Val 438) benachbart zur LEF-1/TCF-Bindungsstelle identifiziert wurde,

## BEST AVAILABLE COPY

- 5 -/ die Verbindungen gemäß anliegender "Drug-Liste" und "Positiv-Liste", die damit Gegenstand des Anspruchs werden, in die identifizierte hydrophobe Tasche eingepaßt, anschließend mit ELISA auf ihre Inhibition der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und seinen Bindungspartnern experimentell überprüft und durch chemische Modifikation optimiert werden.
- 10 5. Substanzen mit einer zur Bindung in der hydrophoben Tasche und Hemmung der Komplexbildung mit  $\beta$ -Catenin essentiellen Kernstruktur, gekennzeichnet durch Cephalosporine vom Typ des Cefamandoles (Molekülklasse IA), wobei die zur Bindung in der hydrophoben Tasche und Hemmung der Komplexbildung mit  $\beta$ -Catenin essentielle Kernstruktur aus einem aromatischem Ring, einer organischen Komponente, die der Struktur des Ala-Ala Dipeptides ähnelt, und einem  $\beta$ -Lactam- und Thiazolring besteht, vorzugsweise sind es Cephalosporine vom Typ des Cefamandoles wie z.B. Cefsulodine, Cefadroxil, oder Cefamandole-Nafate.
- 15 6. Substanzen zur Hemmung der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF gekennzeichnet durch eine Struktur entsprechend der von AC-(6-O-Stearoyl)-Muramyl-Ala-D-Isoglutamine (Molekülklasse IB).
- 20 7. Substanzen zur Hemmung der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF gekennzeichnet durch eine Struktur entsprechend der von 3,6-Dihydroxybenzonobornane (Molekülklasse IC).
- 25 8. Substanzen, die in der hydrophoben Tasche binden ohne die Komplexbildung zu hemmen, die jedoch die Bindung von Cefamandole an  $\beta$ -Catenin beeinflussen, als Leitstrukturen zur Entwicklung von potenten Inhibitoren, vorzugsweise Substanzen aus der Tabelle 'Positiv-Liste' die damit Gegenstand des Anspruchs wird.
- 30 9. Mittel nach Anspruch 1 bis 8 zur Therapie von Tumoren, wie Kolonkarzinomen und Melanomen, zur Gewebsregeneration oder zur Förderung des Haarwuchses.



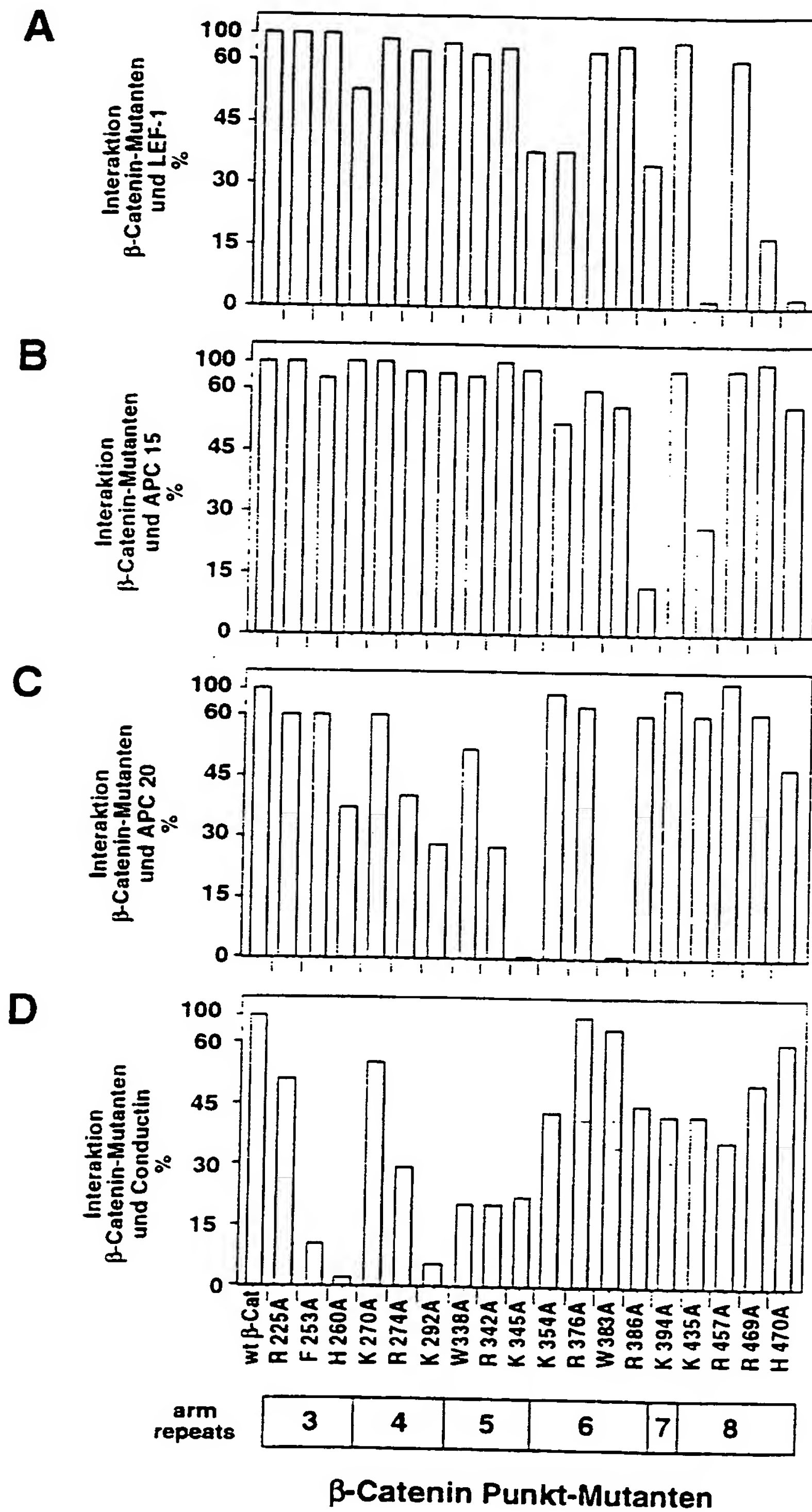
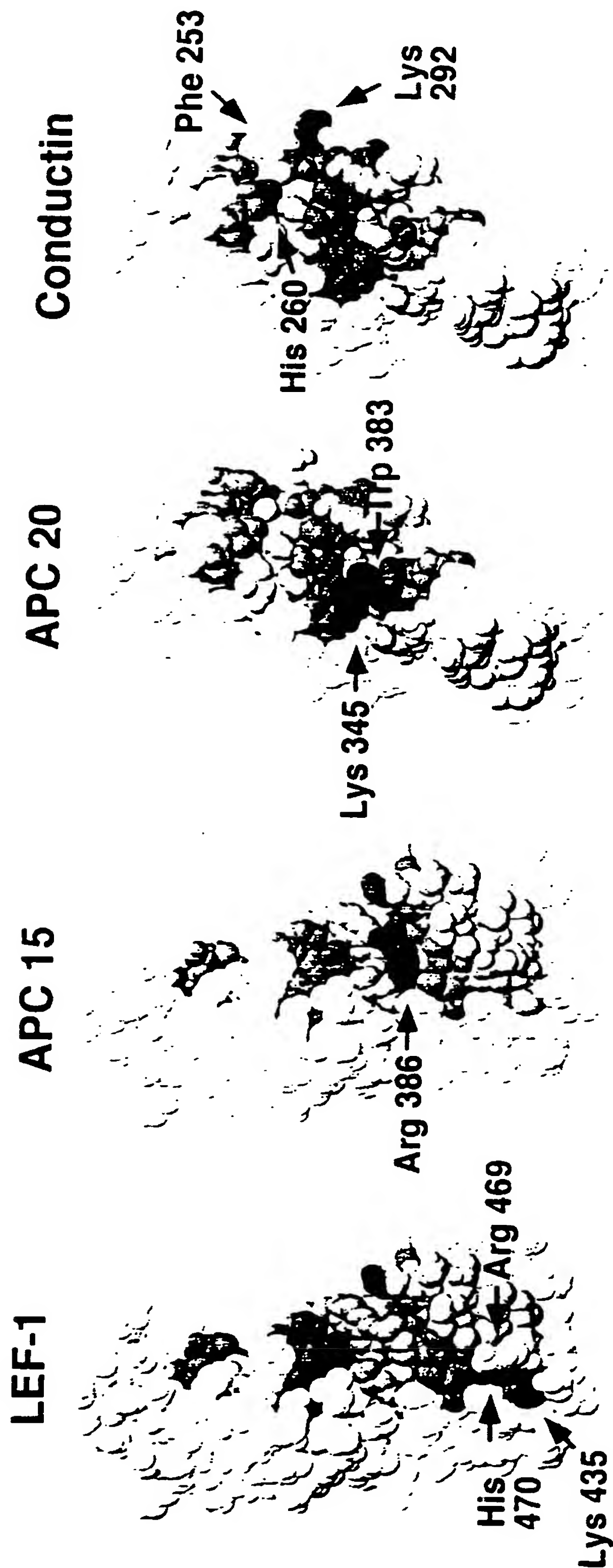


Abb. 1 A-D



**Abb. 1 E**

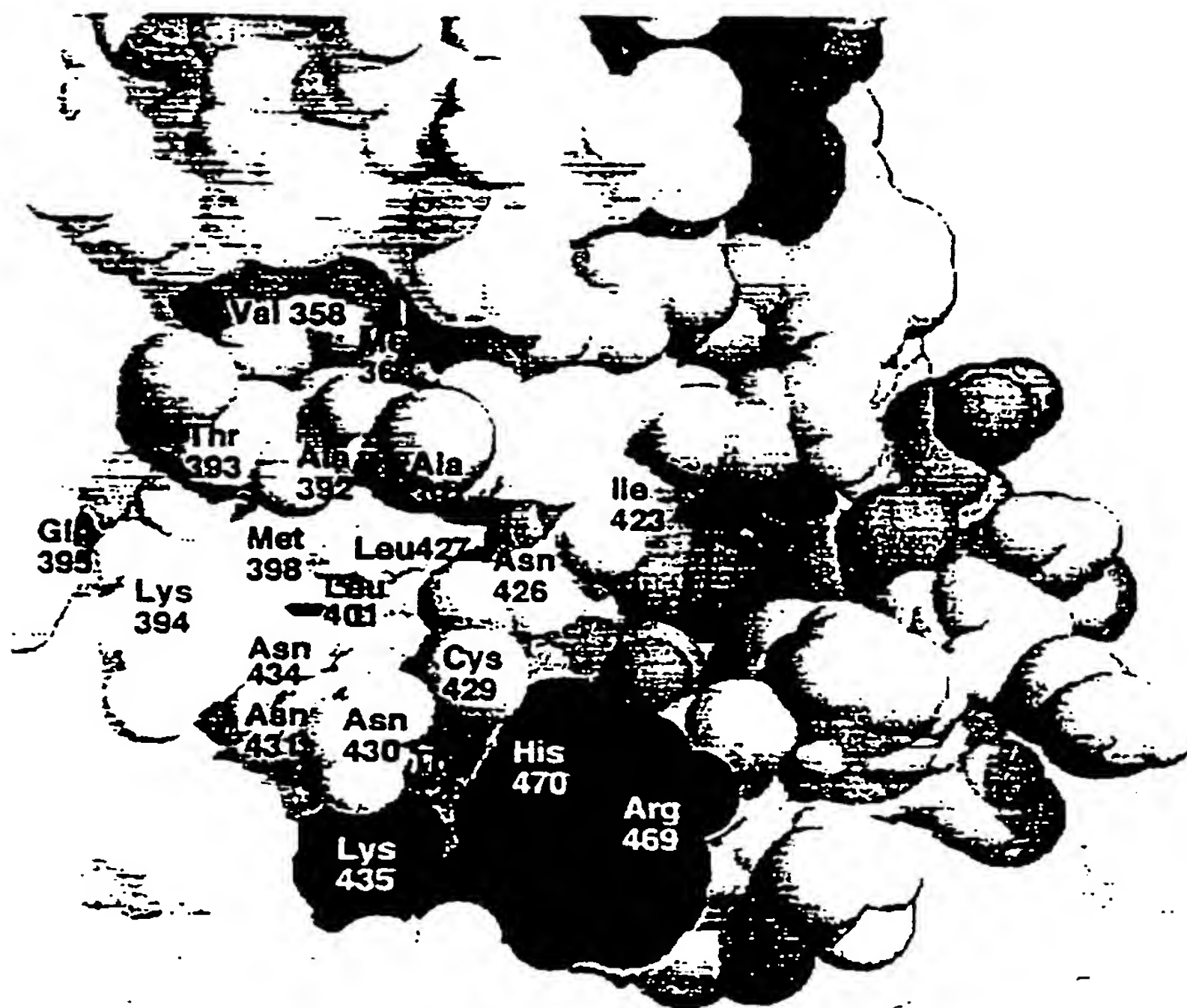
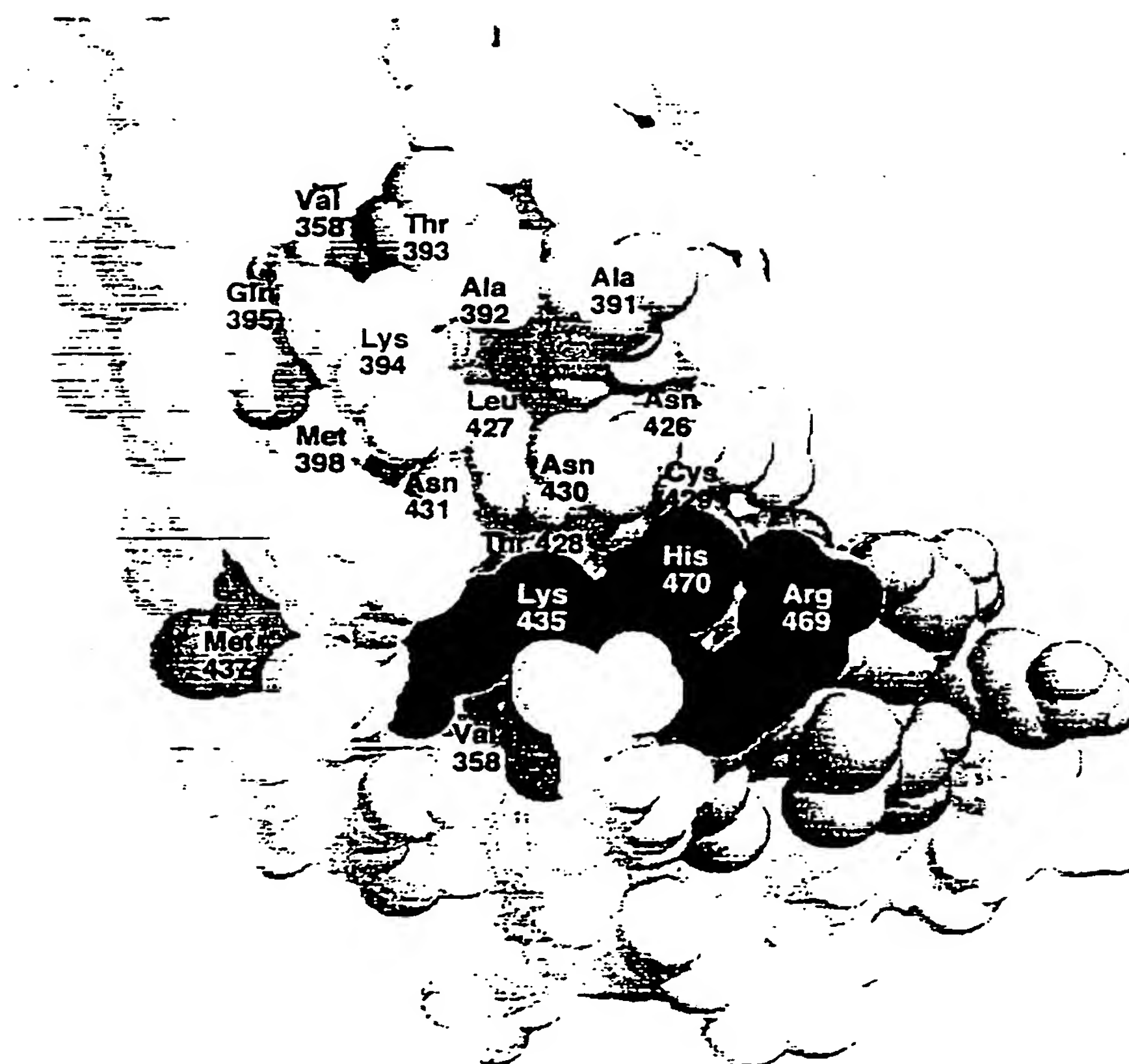
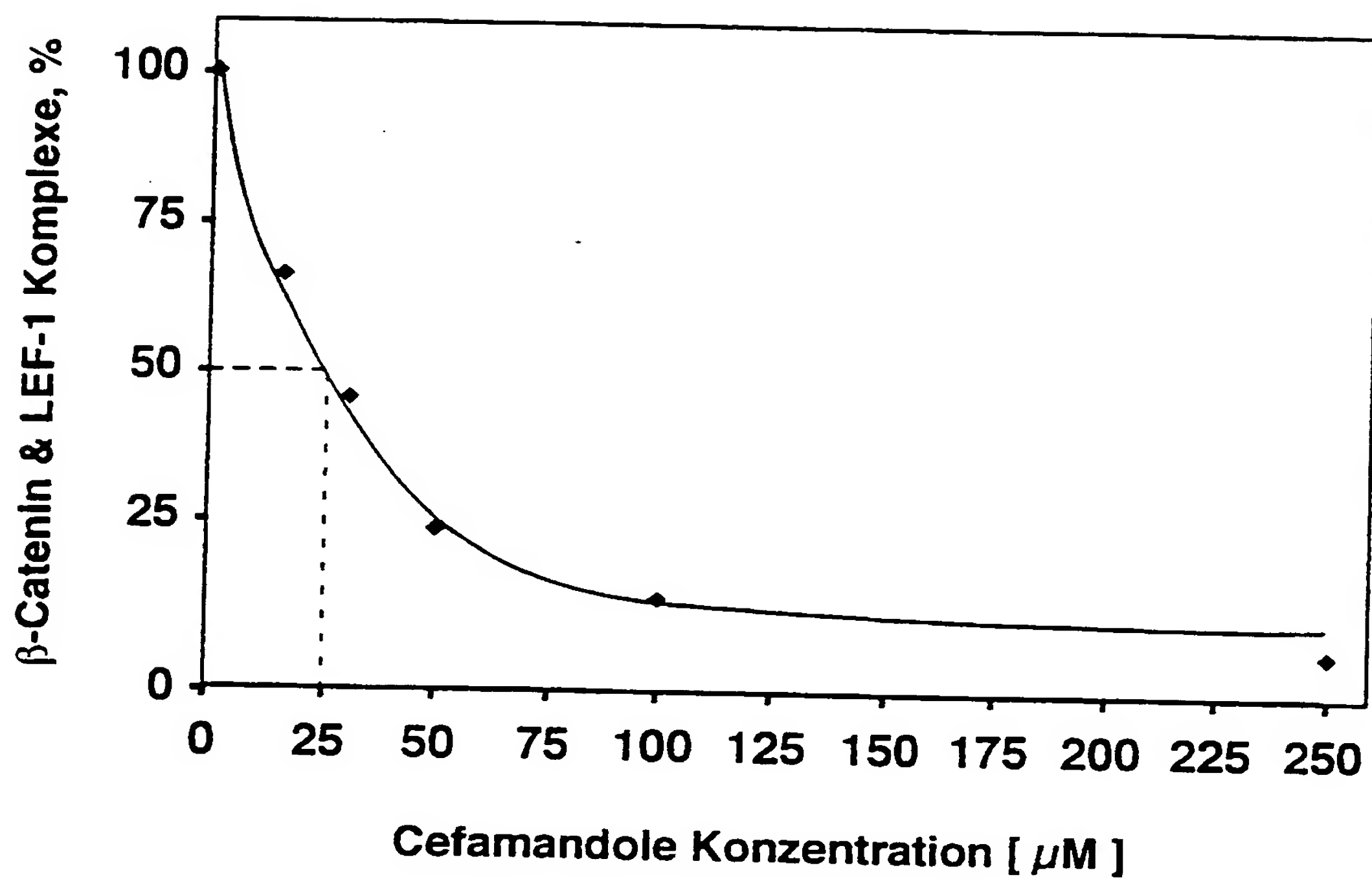
**A****B**

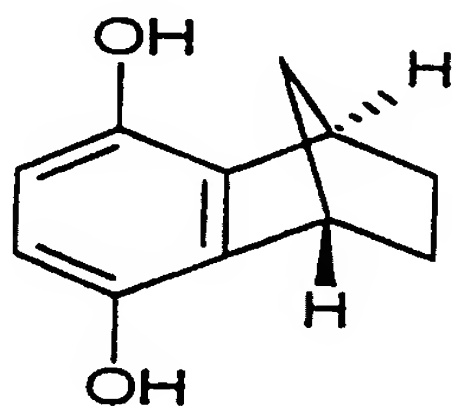
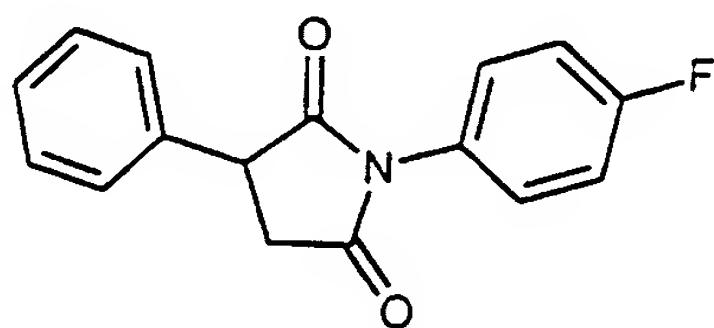
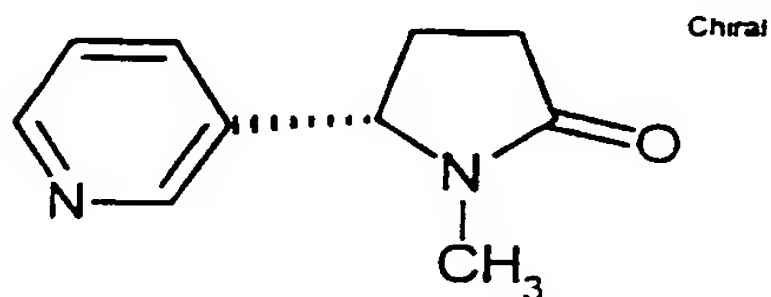
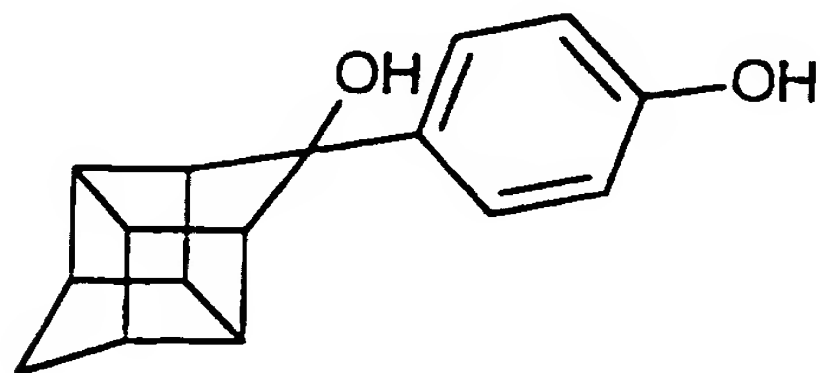
Abb. 2

Abb. 3



**Abb. 4**



**Molekül-Klasse IC****3,6-DIHYDROXYBENZONORBORNANE****Moleküle mit Modulationswirkung für Molekülklasse I****1-(4-FLUOROPHENYL)-3-PHENYLPYRROLIDINE-2,5-DIONE****(-)-COTININE****4-(2-HYDROXYOCTAHYDRO-1,3,4-METHENO-2H-CYCLOBUTA(CD)PENTALEN-2-YL)PHENOL**



COC1=NC(=C(C=C1)C2=NC=CS2)C(=O)N3C(=O)N(CS4C(=O)C(=O)N4C5=CC(=O)C(=C5)SC6=NC7=NC(=O)N7C6=O)C3=O.[Na+]

## Ceftriaxone

CC(C)CCNC(=O)[C@H](C(C)C)N(C(=O)C1OC1)C(=O)O

**L-TRANS-EPOXYSUCCINYL-LEU-3-METHYLBUTYLAMIDE**

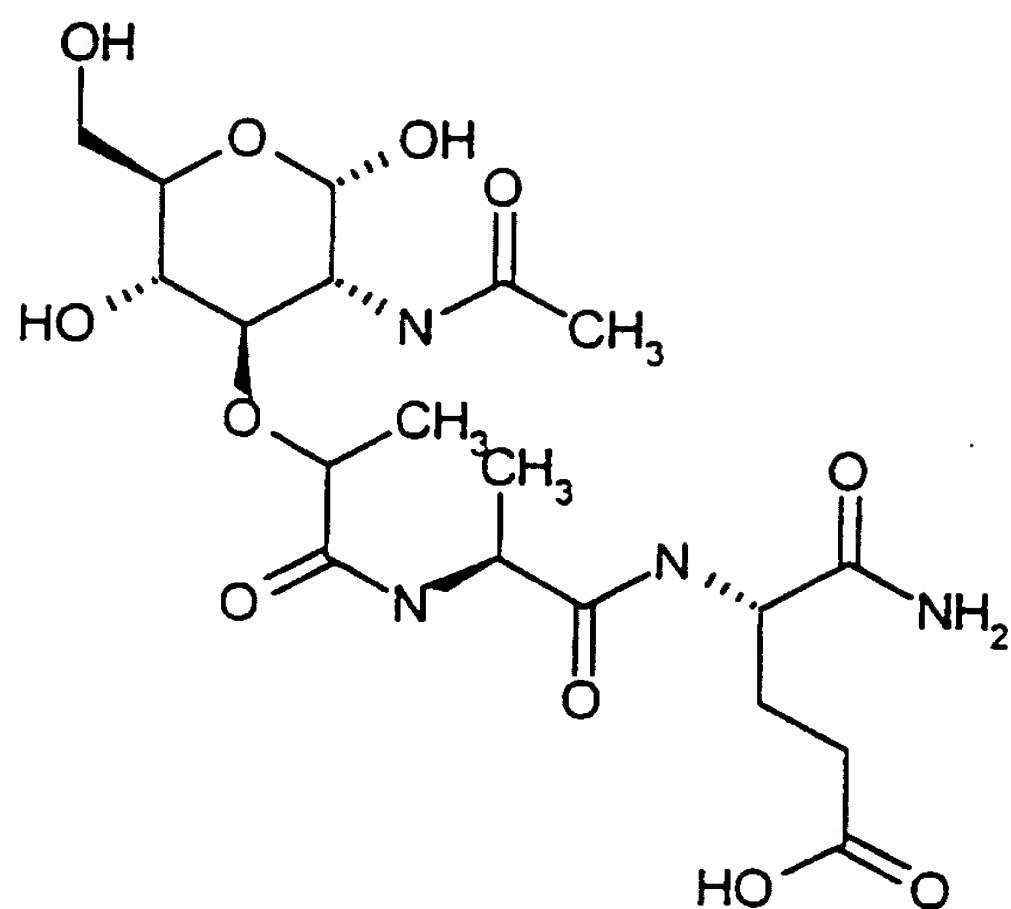
NC(=O)C[C@@H](N)C(=O)N[C@@H](CCCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](C1CCCC(C)C1)C(=O)N[C@H](O)Cc2ccccc2.Cl

## ANTHO-RNAMIDE

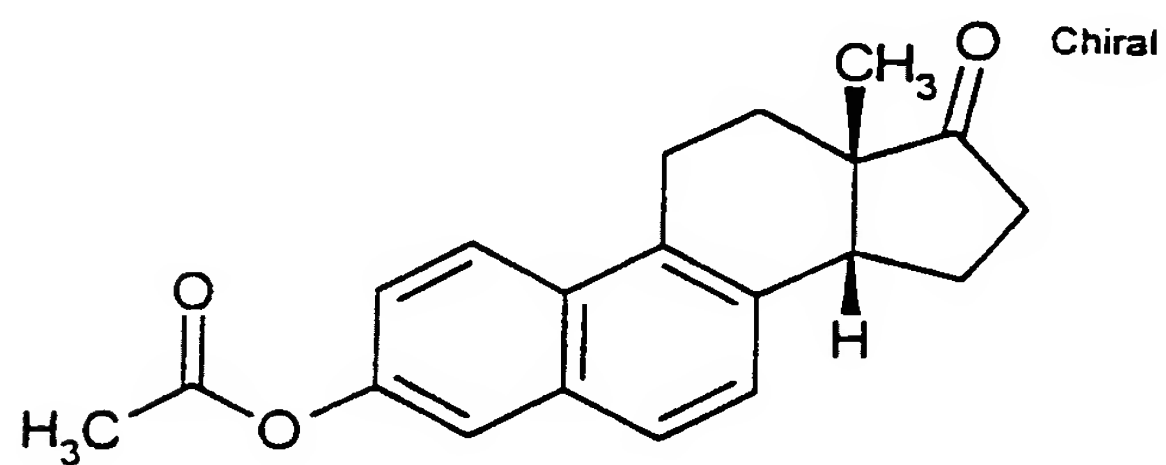


Positiv-Liste

Chiral

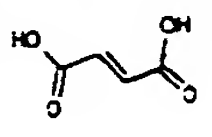
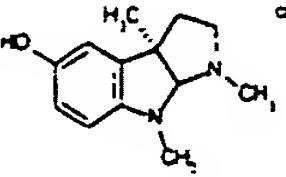
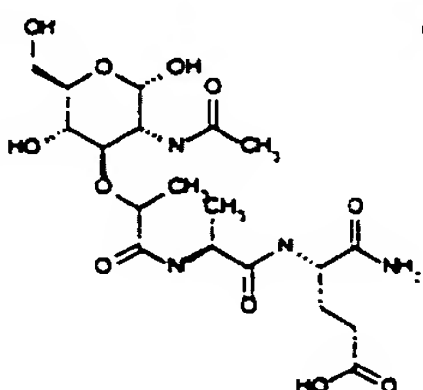
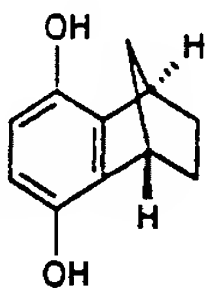
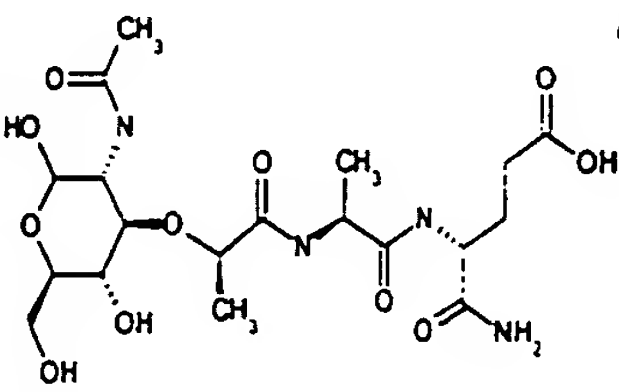
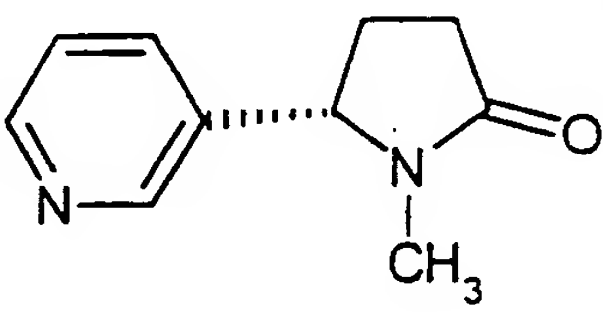
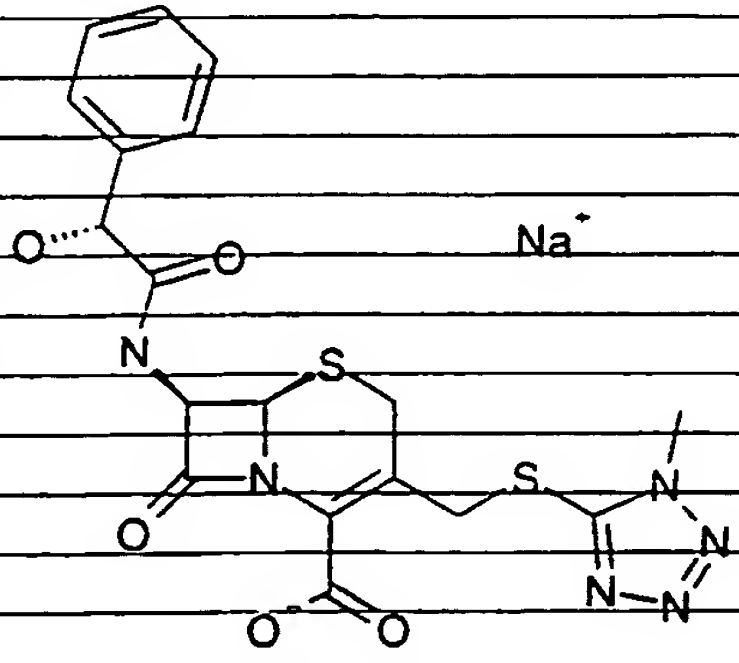


N-ACETYL-MURAMYL-ALA-ISOGLN-OH

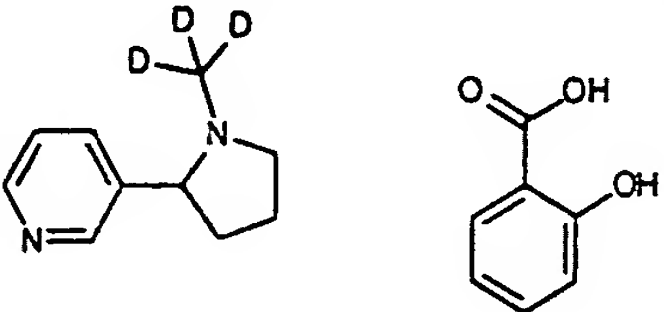
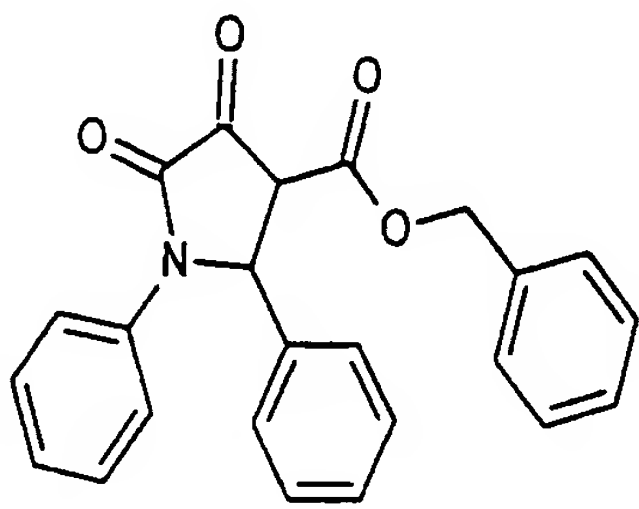
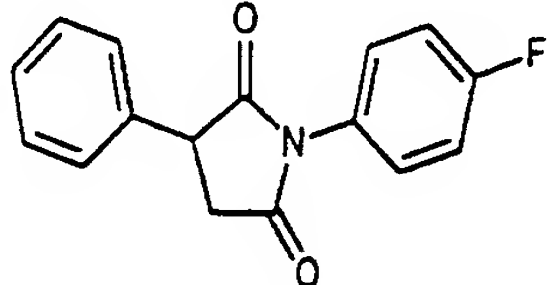
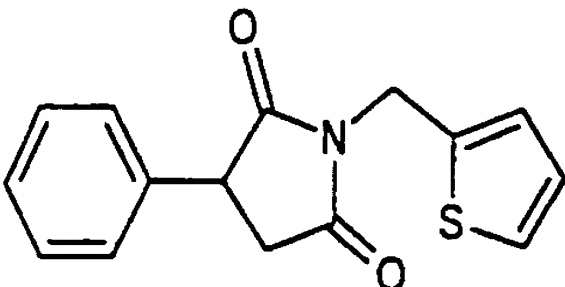
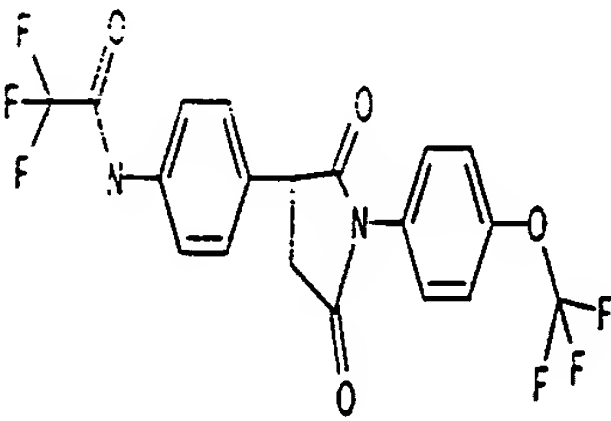
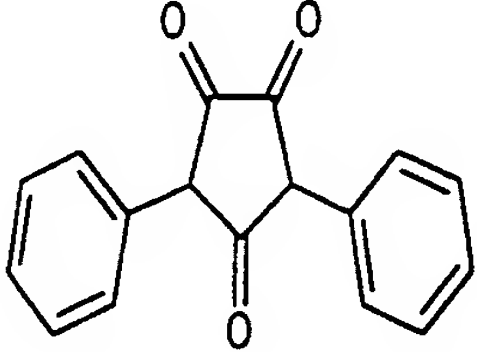


Chiral

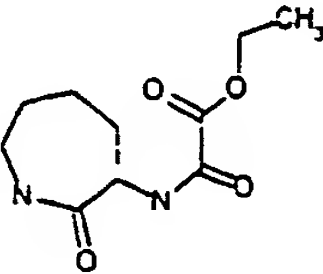
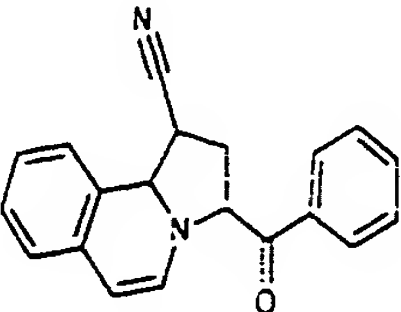
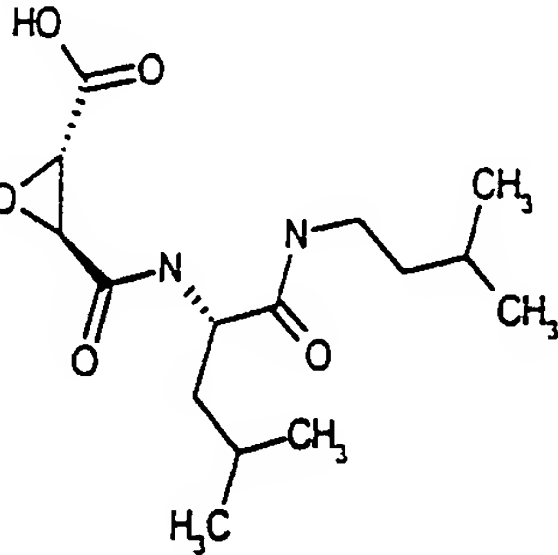
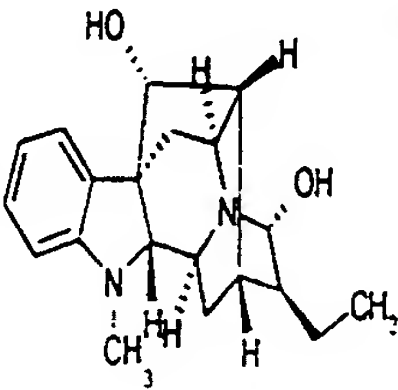
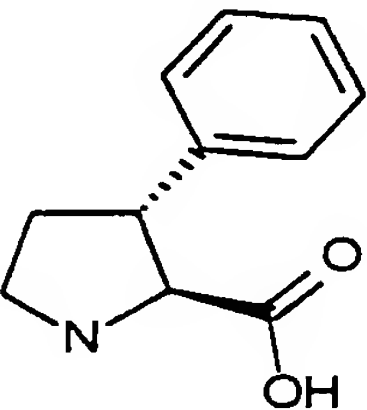
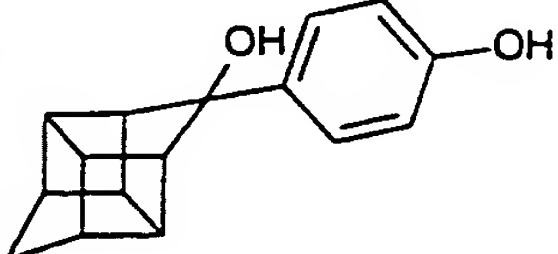
1,3,5(10),6,8(14BETA)-ESTRAPENTAEN-3-OL-17-ONE ACETATE

MOLEKÜLSTRUKTUR	Substanzname	MDL-Nr.
	(-)-ESEROLINE FUMARATE	MFCD00055202
		
	N-ACETYL-MURAMYL-ALA-ISOGLN-OH	MFCD00065478
	3,6-DIHYDROXYBENZONORBORNANE	MFCD00077441
	N-ACETYL-MURAMYL-ALA-D-ISOGLN-OH	MFCD00077638
	(-)-COTININE	MFCD00077696
	CEFAMANDOLE SODIUM SALT	MFCD00082385

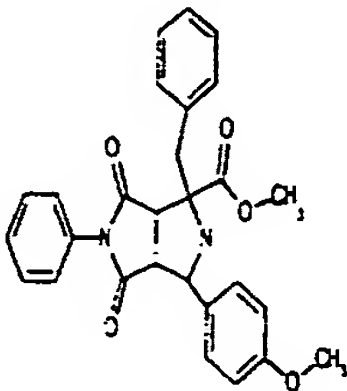
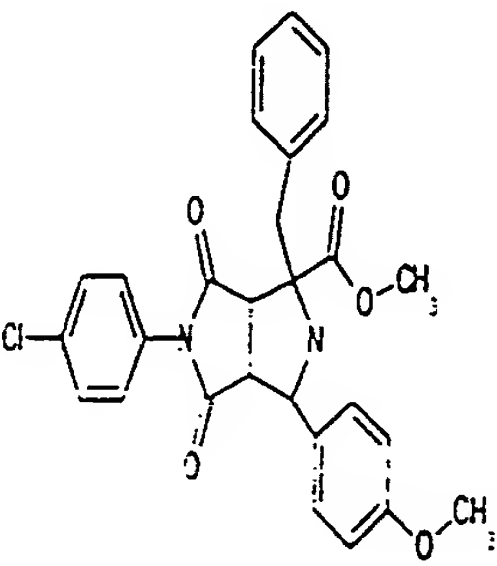
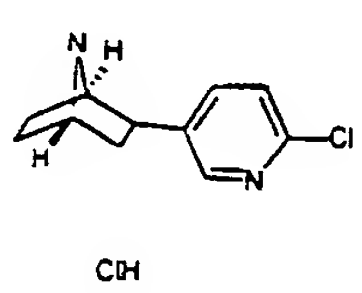
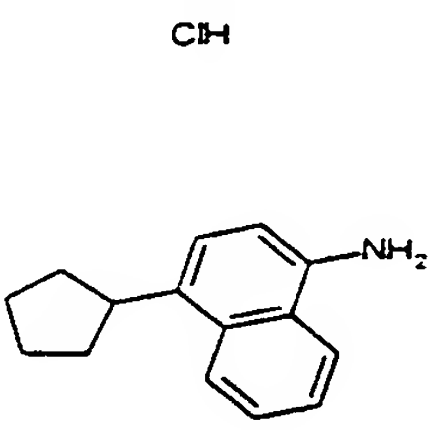
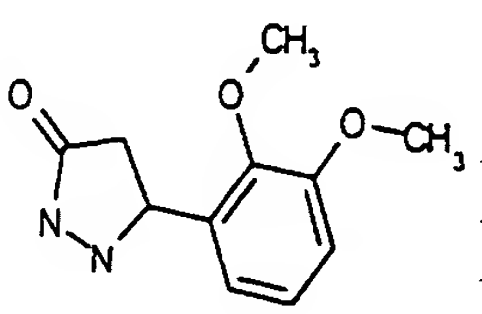
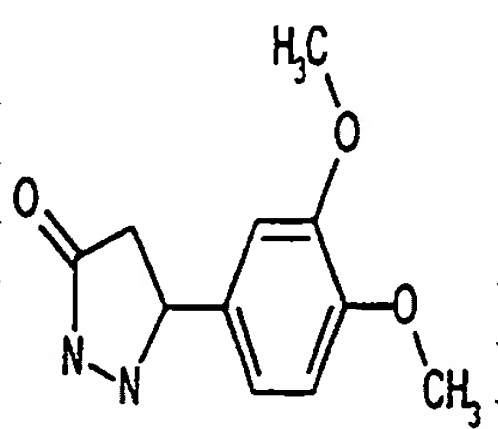
drugs-liste 2000

	(+/-)-NICOTINE-D3 SALICYLATE SALT	MFCD00083448
	BENZYL 1,2-DIPHENYL-4-HYDROXY-5-OXO-3-PYRROLINE-3-CARBOXYLATE	MFCD00088051
	1-(4-FLUOROPHENYL)-3-PHENYLPYRROLIDINE-2,5-DIONE	MFCD00097831
	3-PHENYL-1-(2-THIENYLMETHYL)PYRROLIDINE-2,5-DIONE	MFCD00097832
	N1-(4-[2,5-DIOXO-1-[4-(TRIFLUOROMETHOXY)PHENYL]TETRAHYDRO-1H-PYRROL-3-YL]PHENYL)-2,2,2-TRIFLUOROACETAMIDE	MFCD00100474
	1,3-DIPHENYLCYCLOPENTANE-2,4,5-TRIONE	MFCD00101320

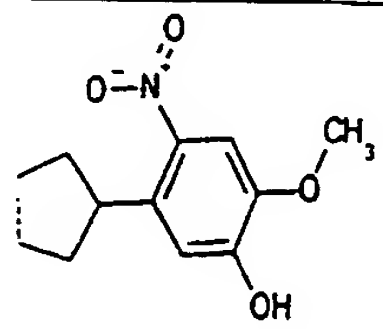
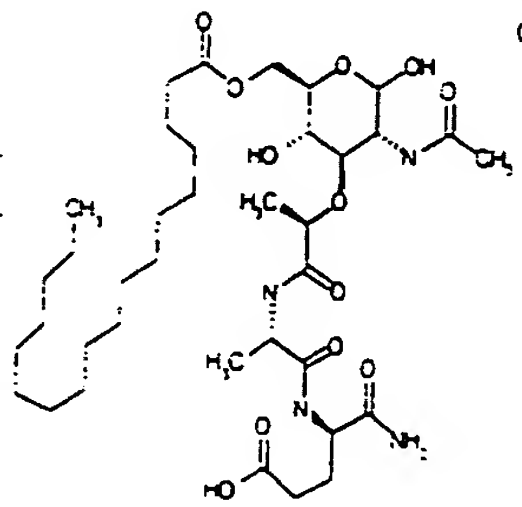
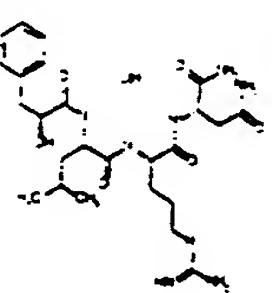
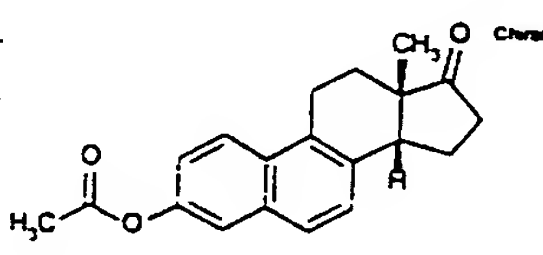
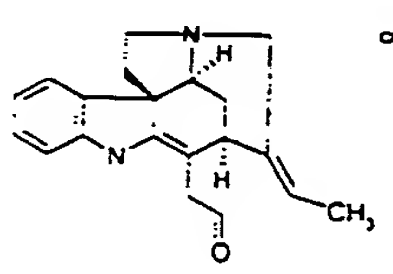
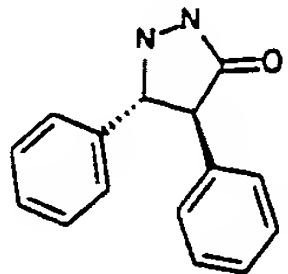
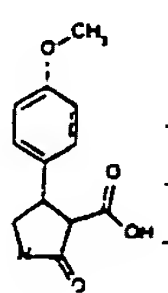
## drugs-liste 2000

	ETHYL 2-OXO-2-[(2-OXOAZEPAN-3- YL)AMINO]ACETATE	MFCD00103142
	3-BENZOYL-1,2,3,10B-TETRAHYDRO- PYRROLO(2,1-A)ISOQUINOLINE-1- CARBONITRILE	MFCD00123443
	Chiral L-TRANS-EPOXYSUCCINYL-LEU-3- METHYLBUTYLAMIDE	MFCD00132882
	Chiral AJMALINE	MFCD00135652
	Chiral (2S,3R)-3-PHENYLPYRROLIDINE-2- CARBOXYLIC ACID	MFCD00142984
	4-(2-HYDROXYOCTAHYDRO-1,3,4-METHENO- 2H-CYCLOBUTA(CD)PENTALEN-2- YL)PHENOL	MFCD00155174

## drugs-liste 2000

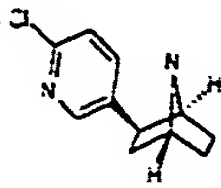
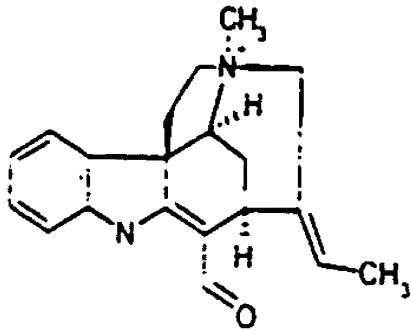
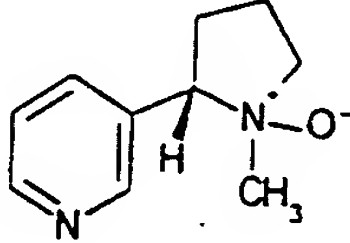
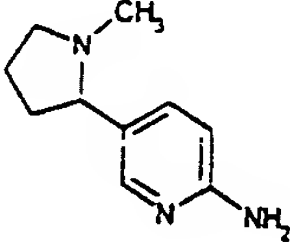
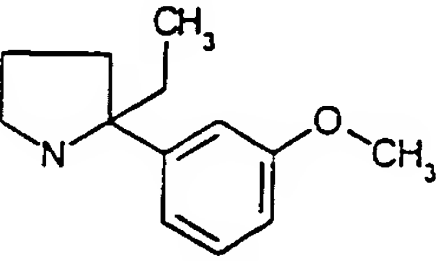
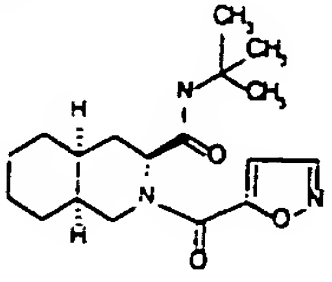
	METHYL C-4-(4-METHOXYPHENYL)-2-BENZYL-7-PHENYL-6,8-DIOXO-3,7-DIAZABICYCLO[3.3.0]-OCTANE-R-2-CARBOXYLATE	MFCD00202518
	METHYL C-4-(4-METHOXYPHENYL)-2-BENZYL-7-(4-CHLOROPHENYL)-6,8-DIOXO-3,7-DIAZABICYCLO[3.3.0]-OCTANE-R-2-CARBOXYLATE	MFCD00202519
	(+/-)-EPIBATIDINE DIHYDROCHLORIDE	MFCD00210196
	4-CYCLOPENTYL-NAPHTHALEN-1-YLAMINE, HYDROCHLORIDE	MFCD00227852
	5-(2,3-DIMETHOXY-PHENYL)-PYRAZOLIDIN-3-ONE	MFCD00228403
	5-(3,4-DIMETHOXY-PHENYL)-PYRAZOLIDIN-3-ONE	MFCD00229211

## drugs-liste 2000

	5-CYCLOPENTYL-2-METHOXY-4-NITRO-PHENOL	MFCD00230901
	AC-(6-O-STEAROYL)-MURAMYL-L-ALA-D-ISOGLUTAMINE	MFCD00236777
	ANTHO-RNAMIDE	MFCD00236789
	1,3,5(10),6,8(14)-ESTRAPENTAEN-3-OL-17-ONE ACETATE	MFCD00271642
	NORFLUOROCURARINE	MFCD00274483
	4,5-DIPHENYLPYRAZOLIDIN-3-ONE	MFCD00277796
	4-(4-METHOXY-PHENYL)-2-OXO-PYRROLIDINE-3-CARBOXYLIC ACID	MFCD00297824



## drugs-liste 2000

	OH (+)-EPIBATIDINE HYDROCHLORIDE	MFCD00467208
	Cl <sup>-</sup> FLUOROCURARINE CHLORIDE	MFCD00467712
	CH <sub>3</sub> (1'S,2'S)-NICOTINE 1'-OXIDE	MFCD00869528
	ClH SPECS SPECS CIF7952	MFCD01114864
	2-ETHYL-2-(3-METHOXYPHENYL)PYRROLIDINE	MFCD01314146
	N-(TERT-BUTYL)-2-(ISOXAZOL-5-YLCARBONYL)DECAHYDROISOQUINOLINE-3-CARBOXAMIDE	MFCD01314517